

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 57-183799  
(43) Date of publication of application : 12.11.1982

(51) Int.Cl.

C07H 21/00  
C12N 15/00  
// C12R 1/13  
C12R 1/15

(21) Application number : 56-058186

(71) Applicant : KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD

(22) Date of filing : 17.04.1981

(72) Inventor : KATSUMATA RIYOUICHI

OKA TETSUO  
FURUYA AKIRA

## (54) NOVEL PLASMID

### (57) Abstract:

NEW MATERIAL: A plasmid having the gene concerning in the streptomycin- and/or spectinomycin-resistance, and autonomically replicable in the bacteria belonging to *Corynebacterium* genus or *Brevibacterium* genus.

EXAMPLE: The plasmid pCG4 having a molecular weight of about 19 mega-dalton. The numbers of the sensitive sites of the plasmid to restriction enzymes are 4, 7, 9, 6 and 6 corresponding to EcoRI, BamHI, HindII, PstI and Sall, respectively.

USE: Useful as a clone-forming vector for bacteria belonging to *Corynebacterium* genus or *Brevibacterium* genus or species close to the above genera, and as a reagent for the research of recombinant DNA.

PROCESS: For example, *Corynebacterium glutamicum* 225-250 (FERM-P No.5939) is cultured, and the bacterial cells are subjected to the bacteriolysis. The objective plasmid pCG4 can be separated from the bacteriolytic product by conventional method.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭57-183799

⑫ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 07 H 21/00  
C 12 N 15/00  
// C 12 R 1/13  
1/15

識別記号

厅内整理番号  
7252-4C  
7235-4B

⑬ 公開 昭和57年(1982)11月12日  
発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 11 頁)

⑭ 新規プラスミド

⑮ 特 願 昭56-58186

⑯ 出 願 昭56(1981)4月17日

⑰ 発明者 勝亦暉一

町田市成瀬2-12-3 ポプラケ  
丘コープ6-401

⑱ 発明者 岡徹夫

町田市旭町1-12-2

⑲ 発明者 古屋晃

川崎市多摩区多摩美1-10-5

⑳ 出願人 協和醸酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6  
番1号

明細書

① 発明の名称

新規プラスミド

② 特許請求の範囲

- (1) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に関する微生物中で自律複製でき、かつストレプトマイシンおよび/またはスペクチノマイシン耐性に誘導する遺伝子を有する新規プラスミド。
- (2) 該プラスミドが、コリネバクテリウム属微生物から得られるととを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のプラスミド。
- (3) 該微生物が、コリネバクテリウム・ダルタミクムに属する微生物であることを特徴とする特許請求の範囲第3項記載のプラスミド。
- (4) 該微生物が、コリネバクテリウム・ダルタミクムヨコナ-250であることを特徴とする特許請求の範囲第3項記載のプラスミド。
- (5) 该プラスミドが、コリネバクテリウム・ダ

ルタミクムヨコナ-250から得られ、約ノックメガダルトンの分子量を有し、かつ制限酵素に対する感受性部位数が EcoRI, BamHI, HindIII, PstI および SalI においてそれぞれ 6, 7, 6 および 6 あることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のプラスミド。

③ 発明の詳細な説明

本発明は新規プラスミドに関する。さらに詳しくは、本発明はコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に関する微生物中で自律複製でき、かつストレプトマイシンおよび/またはスペクチノマイシン耐性に誘導する遺伝子を有する新規プラスミドに関する。

遺伝子工学におけるプラスミドベクターの有用性は、遺伝子工学技術の開発された大腸菌の宿主・ベクター系でよく知られている。遺伝子工学におけるベクターの役割は、レコンビナント・セレキニエルス：インパクト・オン・サイエンス・アンド・ソサイエティ、マイルス・イン

ターナショナル・シンポジウム・シリーズ第  
10 (Recombinant Molecules : Impact  
on Science and Society, Miles International Symposium Series No. 10, edited  
by R. P. Beers and E. G. Bassett, Raven  
Press, New York, 1977)に明解に概説され  
ている。

一方、大腸菌以外の工業的に有用な微生物、  
例えば、アミラーゼなどの生産菌である枯草菌、  
抗生素質などの生産菌である放線菌および製造  
用アルコールの生産菌である酵母などでも組換え  
DNA技術を確立しようとの試みがなされて  
いる。組換えDNA技術の導入には、ベクターの取  
得が必須であるため、これらの菌種ではプラ  
スミドやファージの検索が行われてきた。

本発明者らは、グルタミン酸、リジンなど多  
くの有用物質の工業生産に用いられるコリネバ  
タリウム・ダルタミクムならびにそれに類似  
の菌種で組換えDNA技術を確立せんがために、  
これらの菌種のベクターとなり得るプラスミド

DNA研究用の試薬としても有用であることを  
示している。

本発明のプラスミドはコリネバタリウム属  
またはプレビバタリウム属の菌体から得られ、  
具体的に好適な一例としては、プラスミド  
pCG4と名付けたプラスミドがあげられる。

以下プラスミドpCG4について詳細に説明す  
る。

#### プラスミドpCG4の特徴

- (1) プラスミドpCG4は、分子量約1タメガダ  
ルトンのデオキシリボ核酸(DNA)である。
- (2) プラスミドpCG4は下記制限酵素に対し、  
次の切断感受性を有する。

酵素*	切断部位数
EcoRI	4
BamHI	6
HindIII	7
PstI	6
SalI	6

\* 制限酵素の名称は次の菌種から得られる制

特開昭57-183799(2)

の検索を行なつてきた。その結果、コリネバタ  
リウム属に属する微生物中にベクターとして  
有用性を有する新規なプラスミドが存在するこ  
とを見出し、本発明を完成するに至つた。

以下本発明を詳細に説明する。

本発明は、コリネバタリウム属またはプレ  
ビバタリウム属に属する微生物中で自複製能  
力を、かつストレプトマイシンおよび/または  
スペクチノマイシン耐性に與する遺伝子を有  
する新規プラスミドを提供するものである。

本発明のプラスミドは、そのDNA上にスト  
レプトマイシンおよび/またはスペクチノマイ  
シンに対する耐性遺伝子を所有しており、宿主  
菌に両薬剤に対する耐性形質を付与するこ  
とができる。このことは、所望の遺伝子を組み込ん  
だ組換えプラスミド保有株の取得にあたり、そ  
の選択を効率的に行なうことを可能ならしめ、コ  
リネバタリウム属、プレビバタリウム属、  
およびその近縁菌種におけるクローニングベクタ  
ーとして、極めて有用であるとともに、組換え

酵素の略称である。

EcoRI : エシエリヒア・コリ  
BamHI : バカルス・アミロリクエフアシエンス  
PstI : プロビデンシア・ステニアーティー  
HindIII : ヘモフィラス・インフルエンザ  
SalI : ストレプトマイセス・アルブス

制限酵素による切断部位数は、通常の制限酵  
素存在下でプラスミドpCG4を完全消化し、そ  
れらの消化物を2%のアガロースゲル電気泳  
動にかけ、分離可能な断片の数から決定される。  
分子量は、大腸菌のラムダファージのDNAを  
HindIIIで消化して得られる分子量既知の断片  
[J. Mol. Biol., 98, 551-564 (1975)]  
の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる  
標準線に基づき、消化プラスミドpCG4の各  
断片の分子量を算出し、それらを加算して求め  
られる。

プラスミドpCG4は土壤から分離された菌株  
225-250から得られる。225-250株の  
菌学的性状は下記の通りである。菌学的性質の

検討は、Manual of Microbiological Methods by the Society of American Bacteriologist Committee on Bacteriological Technique (1957) に記載された方法で行つた。

### I 細胞形態

通常  $0.7 \sim 1.0 \times 1.0 \sim 2.0$  ミクロンの横円あるいは短桿状であるが、培養条件により、複数の細胞が直線状あるいはV字型に連鎖したような多形性を示す。グラム陽性、非運動性で胞子をつくらない。

### II 富栄養培地での生育特性

寒天培地上での単集落は円状で表面は光沢をあび、色は淡黄色である。スラント上の生育は同じく淡黄色で不透明である。寒天培地上の穿刺培養では最上部で良く生育し、深部ではわずかに生育する。液体培養ではわずかに生育し若干錐状に沈降する。

### III 生理的性質

1) 溫度：至適温度は  $25 \sim 27$  °C だが、 $42$

- °C でかすかに生育する。  
 2) pH：至適 pH 7 ~ 8 だが、pH 6 ~ 9 でも生育可能である。  
 3) 非熱耐性  
 4) 好気性  
 5) ゼラチンを液化しない  
 6) カゼインを分解代謝しない  
 7) イシドール生産性  
 8) カタラーゼ陽性  
 9) 腺粉非同化性  
 10) グルコース、フラクトース、マンノース、マルトースから酸を生成するが、キシロース、ガラクトース、ラクトースおよびグリセロールからは酸を生成しない。  
 11) ピオテン要求性  
 12) ピオテン量制限培地では多量のグルタミン酸を產生する。  
 13) 高濃度ピオテン含有培地では乳酸および  $\alpha$ -ケトグルタル酸を產生する。

以上の結果は、J. Gen. Appl. Microbiol.,

23, 279-301 (1967) に記載された細菌群と比較すると、コリネバクテリウム・グルタミクムに極めてよく一致している。それ故、ヨコナ-ヨタロ株をコリネバクテリウム・グルタミクムと同定した。

コリネバクテリウム・グルタミクムヨコナ-ヨタロは上記の如く分類学的特性においては、通常のコリネバクテリウム・グルタミクムと相違点が認められないが、唯一の相違点としてストレプトマイシンおよびスペクチノマイシンに対する耐性形質を保持することが特徴的である。本菌株にプラスミドの一般的除去操作を施すことによって、ストレプトマイシンおよびスペクチノマイシン耐性形質を同時に喪失した誘導株が分離される。これらの薬剤感受性株には pCGF の存在が認められることから、ストレプトマイシンおよびスペクチノマイシン耐性遺伝子は pCGF 上に担われていることが明白である。

なお、コリネバクテリウム・グルタミクム

ヨコナ-ヨタロおよびその pCGF 搭載株の一株であるコリネバクテリウム・グルタミクムヨコナ-1 株は微生物工業技術研究所に寄託され、それらの寄託受理番号は各々ヨタ39、ヨタ40 である。さらに、米国アメリカンタイプ・カルチャーレ・コレクションに各々、ATCC31830、ATCC31831 として寄託されている。

コリネバクテリウム・グルタミクムヨコナ-ヨタロの菌体中からプラスミド pCGF を抽出するためには、まず培養細胞を溶解しなければならないが、一般にコリネバクテリウム属菌種およびその類似菌種の单に培養した細胞は、細胞細胞壁溶解酵素即白リソチームに感受性であるので培養細胞は即白リソチームに感受性にしてから用いるとよい。コリネバクテリウム・グルタミクムヨコナ-ヨタロをリソチーム感受性にするには、コリネバクテリウム・グルタミクムと同様にグラム陽性でもともと即白リソチーム非感受性のストレプトコツカス・フェカリス [Can. J. Microbiol., 7, 363-373 (1961)]

に施される公知の方法を適用することができる。すなわち、細胞培養の対数増殖期の中途で、生育を抑制しないか、あるいは半抑制する濃度（通常培養液中の $1/10$ ～ $1/100$ ppmとなる濃度）のペニシリンを添加し、さらに数世代増殖することによって目的が達せられる。その服用による培地および培養方法は一般にコリネバクテリウム・グルタミクムおよびその近縁菌種の培養に用いられる液体培地およびその培養方法が適用できる。このようにペニシリン処理したコリネバクテリウム・グルタミクムヨコタ-330の培養細胞は、リゾチームにより容易に細胞壁が溶解される。溶菌物からは、例えば Biochim. Biophys. Acta. 373, 457-463 (1973) に記載されたような通常用いられる方法により、プラスミド pCO4 を容易に継続分離できる。

即ち、溶菌物にラクリル硫酸ナトリウムと NaCl を加えて処理し、溶解したプラスミドを遠心分離により上澄液として回収後、これにポリエチレングリコールを添加して DNA を沈

殿後錠し、再溶解した沈殿物をエチジクムプロマイド-塩化セシウム密度勾配遠心にかけ、プラスミド pCO4 を単離する。

コリネバクテリウム・グルタミクムおよびその近縁菌種において選択可能な遺伝形質を有した自律複製可能なプラスミドの存在は今まで知られておらず、本発明者らにより初めて見出されたものである。

プラスミド pCO4 は、コリネバクテリウム・グルタミクムだけでなく、コリネバクテリウム属の他の菌種あるいはブレビバクテリウム属の菌種でも自律複製すると同時にその上に存在するストレプトマイシンおよびスペクチノマイシン耐性遺伝子に由来する耐性形質をそれらの宿主菌に付与することができる。プラスミド pCO4 をこれらの菌種に形質転換する方法は、本出願と同日に提出する特許出願〔発明の名称：微生物の形質転換法〕に開示したが、具体的方法を実施例として後述する。この形質転換法により取得された菌株としては第 1 表に

pCO4\* として示されたものをあげることができる。

### 第 1 表

菌 株	pCO4	最小生育阻止濃度 (MIC, $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	
		スペクチノ	ストレプト マイシン
コリネバクテリウム・グルタミクム ヨコタ-330	+	≥800	200
コリネバクテリウム・グルタミクム ヨコタ-1	-	25	3.2
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC/3868	-	25	3.2
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC/3868/pCO4	+	≥800	200
ブレビバクテリウム・フラブル ATCC/4067	-	25	3.2
ブレビバクテリウム・フラブル ATCC/4067/pCO4	+	≥800	200
ブレビバクテリウム・ラクトフアーメンタム ATCC/3633	-	25	1.6
ブレビバクテリウム・ラクトフアーメンタム ATCC/3633/pCO4	+	≥800	100

これら pCO4 保有株、すなわちコリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC/3868/pCO4、

ブレビバクテリウム・フラブル ATCC/4067/pCO4、ブレビバクテリウム・ラクトフアーメンタム ATCC/3633/pCO4 は工業技術院微生物工業技術研究所に寄託され、各々寄託受託番号 54911、54912、54913 がつけられている。また米国アメリカン・タイプ・カルチャーレ・コレクションに各々 ATCC/3868、31833 および 31834 として寄託されている。

プラスミド pCO4 が分離された元株コリネバクテリウム・グルタミクムヨコタ-330 株、それから誘導されたプラスミド pCO4 損失株ヨコタ-1 株およびプラスミド pCO4 で形質転換された他の菌種の菌株のストレプトマイシンとスペクチノマイシンに対する感受性度を両薬剤の最小生育阻止濃度で測定した結果を第 1 表に示した。最小生育阻止濃度は、N B 培地（粉末ブイヨン 20g、酵母エキス 5g、寒天 1.5% を調水 1L に含み、pH 7.2 に調整した培地）上に約  $10^6$  細胞を播布擴種して 30℃

で2日間培養後、生育の全く認められない程度である。

本発明のプラスミドの有用性は、アミノ酸、核酸などの有用物質の生産に用いられる工業上重要なコリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属菌種中で自律複製でき、それを保有する菌の検出を可能にするストレプトマイシンおよびまたはスペクチノマイシン耐性遺伝子を保有し、さらには種々の制限酵素の切断点を有する特性にある。

これらの特性により、本発明のプラスミドはコリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属の菌種を宿主菌にして周知のDNA組換え技法で任意の遺伝子をクローニングするのに必要なベクターとしての条件を備えている。従つて、本発明のプラスミドは、これらの細菌種または他の微生物からアミノ酸などの有用物質の生合成あるいはその調節に関与する遺伝子をクローニング化し、その遺伝情報の増幅に基づく生合成系の強化により有用物質の生産量を増大せしめた

り、さらには動植物の遺伝子をクローニング化し、その遺伝情報の発現により有用な蛋白質を生産せしめるための手段を提供することができる。クローニング化は、試験管内で作成されたベクタープラスミドとの組換えDNA構成物を宿主菌に導入後、目的の遺伝子を組み込んだプラスミドを保有する株を選択することによつて行われるが、本発明プラスミド上に存在するストレプトマイシンあるいはスペクチノマイシン耐性遺伝子は目的のクローニング化株の選択を容易ならしめることができる。すなわち、目的のクローニングすべき遺伝子がそれに由来する形質で選択できるときはストレプトマイシンあるいはスペクチノマイシン耐性形質の同時獲得性により目的のクローニング化株の把握を確実に行い得るし、また、目的のクローニング化すべき遺伝子がその形質で選択できないときもその取得に先立つて一旦ストレプトマイシンあるいはスペクチノマイシン耐性形質でプラスミド保有株を選抜することにより目的のクローニング化株の取得を効率化し得る。

本発明プラスミドの自律複製能および宿主にストレプトマイシンあるいはスペクチノマイシン耐性形質を付与する遺伝子は、一般のプラスミドと同様にプラスミドDNAの一部分に組われていることが容易に推測されるので、例えばプラスミドの一領域を欠失したり、あるいは別のDNAを挿入付加したようなプラスミド酵導体も同様な機能を有すると考えられる。

また、本発明プラスミドのストレプトマイシンあるいはスペクチノマイシン耐性遺伝子を含むDNA断片は、周知のDNA組換え技法で識別可能な特異的遺伝子をもたない他のプラスミドへ連結することができ、そのような組換え体も、ベクターとして同様な有用性を有することになる。

それゆえ、本発明プラスミドは、例示したPCO\*に限定されるものではなく、それより簡略して得られる酵導体プラスミドや他のプラスミドとの組換え体プラスミドも含まれる。

以下に実施例を示す。

#### 実施例1

##### (1) コリネバクテリウム・グルタミクムヨウヌ-250の培養細胞からのプラスミドPCO\*の分離

コリネバクテリウム・グルタミクムヨウヌ-250をNB培地(粉末ブイヨン20g、酵母エキス5gを純水1Lに含み、pH 7.2に調整した培地)で、30°C、18時間振盪培養し、その種培養液を400ml半合成培地SSM(グルコース20g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10g、尿素3g、酵母エキス1g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g、MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.4g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0g、MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.2g、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.05g、Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 0.05g、(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.01g、ビオチン30μg、サイアミン塩酸塩1mgを純水1Lに含み、pH 7.2に調整した培地)に接種して30°Cで振盪培養する。東京光電比色計で660nmにおける吸光度(OD)を測定し、OD 0.2に達した

時点で、培養液中 0.5 単位/ml の濃度になるようにペニシリン G を添加する。さらに 30 ℃で培養を継続し、OD 約 0.6 になるまで生育させる。

培養液から菌体を集め、TES 緩衝液 [0.03M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (トリス)、0.005M EDTA、0.05M NaCl : pH 8.0] で洗浄後、リゾチーム液 (ヨクヨウシヨ糊、0.1M NaCl、0.05M トリス、0.8% / ml リゾチーム : pH 8.0) で 10 分間懸濁し、37 ℃で 4 時間反応させる。反応液に、0.1M NaCl 24 ml、0.5M EDTA (pH 8.5) 0.6 ml、キララクリル硫酸ナトリウムと 0.7M NaCl からなる溶液 6 ml を順次添加し、緩やかに混和してから氷水中に 1 時間置く。溶出物全量を透心管に移し、4 ℃で 60 分間、6,000 × g の透心分離にかけ上澄液をとる。これに重量百分率 10% 相当のポリエチレングリコール 4000 を加え、静かに混和して溶解後氷水中に置く。

このようにして得られるプラスミド pCGK を含む透析液 1 ml に 2 ml のエタノールを加え、-20 ℃に 1 時間おいた後、10,000 × g で 30 分透心分離して DNA を沈降させ、さらに真空乾燥を行つて 20 μl のプラスミド pCGK が得られる。

#### (2) プラスミド pCGK の各種制限酵素による切断特性および分子量。

前記で調製したプラスミド pCGK 0.5 μg を 10 μl の TBE 緩衝液 (pH 8.0) に添加し、2 倍過剰量の制限酵素 (EcoRI, BamHI, HindIII, PstI および SalI は宝酒造社製のものを使つた) を各々の制限酵素の適正条件にて反応させた。消化した試料は常法に従い、エチジウムプロマイド 0.6 μg / ml を含有する水平型 0.8% アガロースゲルに供し、巾 1 cm 当り 7 V の一定付加電圧で 3 ~ 4 時間泳動を行つた。紫外線ランプをゲル平板上に照射して生成断片の数を判定し、各断片の泳動距離から各々の分子量を算出し、

16 時間後、1,500 × g で 10 分間遠心分離してペレットを回収する。TES 緩衝液 5 ml を加えて、ペレットを静かに再溶解してから 1.5 ml / ml エチジウムプロマイド 20 mg を添加し、これに塩化セシウムを加えて静かに溶解し、密度を 1.380 に合わせる。この溶液を 10,500 × g、1 ℃で 4 小時遠心分離する。この密度勾配遠心により、共有結合で閉じられた環状の DNA は、紫外線ランプを照射することによつて遠心チューブ中下方の密度の高いバンドとして見出される。このバンドを注射器で遠心チューブの側面から抜きとることによつて、プラスミド pCGK が分離される。次いで分画液を等容量のイソプロピルアルコール液 [容量百分率 10% イソプロピルアルコール、10% TBE 緩衝液 (この混合液中に飽和溶解量の塩化セシウムを含む)] で 2 回処理してエチジウムプロマイドを抽出除去し、しかしる後に、TBE 緩衝液に対して透析する。

それらを加算してプラスミド pCGK の分子量を求めた。なお、分子量は同一アガロースグル上で同時に泳動したラムダファージ DNA の HindIII 消化で生成する分子量既知の各断片の泳動距離で描かれる標準線に基づいて算定した。結果を第 2 表に示す。

第 2 表

酵素	切 断 部位数	各生成断片の分子量 (メガダルトン)	加算して得ら れる pCGK の分子量 (メガダルトン)
EcoRI	4	587, 351, 475, 422	20.25
BamHI	6	928, 271, 257, 205, 132, 086	18.95
HindIII	9	515, 462, 303, 195, 133, 097, 082, 079, 037	19.03
PstI	6	7.71, 475, 362, 130, 126, 079	19.83
SalI	6	7.72, 476, 364, 130, 127, 087	19.64

## 実施例 2

コリネバクテリウム・ヘーキニリス ATCC 13868、プレビバクテリウム・フラム

特開昭57-183799(7)

ATCC/4067およびプレビバクテリウム・ラクトフアーメンタム ATCC/3655 の pCO# 保有株の調製

NB 培地で培養した種培養の 0.07 ml を 7.5 ml SSM 培地に播種し、30°C で振盪培養する。東京光電比色計で 660 nm における吸光度 (OD) を測定し、OD 0.1 になつた時点で 0.5 単位/ml になるようにベニシリソロを添加する。さらに OD 約 0.5 になるまで培養する。培養液から細胞を集団し、該細胞を SSM で洗浄し、最終濃度 0.5 mg/ml のリゾチームを含む PFM 培地 (SSM 2 倍希釈液中にシロ糖 0.4 M, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.01 M を含み、pH 7.6 に調整した培地) 2 ml に懸濁する。30°C で 1 時間反応して細胞をプロトプラスト化する。

プロトプラスト液 0.5 ml を小試験管にとり、2500 × g で 5 分間遠心分離し、沈降した細胞を TSMC 濾液液 [10 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 10 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 500 mM コハク酸二ナトリウム、50 mM トリス (ヒドロキシメチル)

アミノメタン (トリス) ; pH 7.5] / ml に懸濁して遠心洗浄する。0.1 ml の TSMC 濾液液を加えゆるやかに振つてプロトプラストを再懸濁する。これに上記の 3 倍高濃度の TSMC 濾液液と 1 対 1 に混合した pCO# DNA 液 0.1 ml (0.2 μg DNA 含有) を加えて混和し、次いで TSMC 濾液液中にヨウ素ポリエレングリコール 6000 を含む液 0.8 ml を添加してゆるやかに混合する。1 分後、RCG 培地 (グルコース 5.5 g, カゼインハイドロライゼート 5.5 g, 酒母エキス 5.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.4 g / l, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.0 mg, MnSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O 2 mg, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.9 mg, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.04 mg, ピオナン 3.0 μg, サイアミン塩酸塩 2 mg, コハク酸二ナトリウム 1.5 g を純水 1 l に含み、pH 7.2 に調整した培地) 2 ml を添加し、2500 × g で 5 分間遠心にかけて上澄み液を除去し、沈降したプロトプラストを 1 ml の RCG 培地に懸濁し、直ちに RCG 培地で希釈し、一

定量を RCGP 奉天培地 [RCG 培地にヨウ素ポリビニールビロリドン (重合度 500) と 1.4% 奉天を含む培地] に塗布して 30°C で 10 日間培養する。

RCGP 奉天培地上に再生増殖した菌を白金耳でかき集め、NB 培地 2 ml に懸濁した菌液を希釈し、一定量を 1.25 μl/ml の streptotomycin を含む NB 奉天培地に塗布する。30°C で 2 日間培養して出現したコロニーをスペクチンマイシン 100 μg/ml を含有する NB 奉天培地にレブリカ塗布し、30°C で 2 日間培養して生育した株を pCO# の形質転換供精株として取扱した。

コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868/pCO#、プレビバクテリウム・ラブリム ATCC/4067/pCO# およびプレビバクテリウム・ラクトフアーメンタム ATCC/3655/pCO# はこうして得られた株である。これらの株の培養菌体から実施例 1 と同じ方法でプラスミドを単離し、各種制限酵素によるア

ラスミド DNA の切断様式を調べた結果、pCO# と全く同一の切断片を生成した。

特許出願人 (102) 島和酸酵工業株式会社

代表者 木下祝郎

手 続 楽 正 書

昭和 57 年 6 月 16 日

特 許 庁 長 官 附

1. 事件の表示

昭和 56 年 特許願 第 56186 号

2. 発明の名称

新規プラスミド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 100

住 所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

名 称 (102) 純和酵解工業株式会社

(TEL: 03-201-7211 内線 2751)

代表者 木下 祐郎

4. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲の構成および発明の詳細な説明の構成

5. 補正の内容

(1) 特許請求の範囲を別紙のとおり記載する。

特許請求の範囲

- (1) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物中で自複複製でき、かつストレプトマイシンおよび/またはスペクチノマイシン耐性に與与する遺伝子を有する新規プラスミド。
- (2) 該プラスミドが、コリネバクテリウム属微生物から得られることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のプラスミド。
- (3) 該微生物が、コリネバクテリウム・グルタニクムに属する微生物であることを特徴とする特許請求の範囲第2項記載のプラスミド。
- (4) 该微生物が、コリネバクテリウム・グルタニクム 225-250 であることを特徴とする特許請求の範囲第3項記載のプラスミド。
- (5) 该プラスミドが、コリネバクテリウム・グルタニクム 225-250 から得られ、約 1.9 メガダルトンの分子量を有し、かつ制限酵素に対する感受性部位数が EcoRI, BamHI, HindIII,

特開昭57-183799(8)

- (2) 明細書第3頁2行目の「Impact」を「Impact」に訂正する。
- (3) 明細書第12頁最下行の「として」を削除する。
- (4) 明細書第13頁1~2行目を「示した。」に訂正する。
- (5) 明細書第18頁10行目の「グルコース 20%」の後に「、」を加入する。

PstI および SacI においてそれぞれ 4, 7, 9, 6 および 6 であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のプラスミド。

(6) 特許請求の範囲第1項記載のプラスミドの一部領域を欠失させるか、該プラスミドに他の DNA 断片を挿入するか、またはその両者をして得られるプラスミド構成体。

手続補正書

昭和56年12月17日

特許庁長官

1. 事件の表示

昭和56年特許願第56186号

2. 発明の名称

新規プラスミド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 100

住所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

名称 (102) 留和謹業工業株式会社

(TEL : 03-201-7211内線 2751)

代表者 木下祝郎

4. 補正の対象

願書の「添付書類の目録」の欄、明細書の  
「特許請求の範囲」の欄、「発明の詳細な説  
明」の欄および「図面の簡単な説明」の欄

5. 補正の内容

特開昭57-183799(8)

(1) 明細書第17頁下から3行目の後に次の記  
載を加入する。

「pCO4由来のストレプトマイシンおよび/ま  
たはスペクテノマイシン耐性遺伝子を含むDNA  
断片を他のコリネバクテリウム属またはブレ  
ビバクテリウム属菌種のプラスミドへ連結し  
た組換え体プラスミドの作製は、公知の試験  
管内DNA組換え技法を駆使することにより  
可能である。試験管内DNA組換えは基本的  
にはpCO4の耐性遺伝子を含むDNA断片を  
プラスミド切断片にDNAリガーゼを用い連  
結せしめることによつて行われる。DNAの  
断片化は通常制限酵素を用いれば容易にでき  
る。連結はT4ファージDNAリガーゼを用  
いて行われる。この酵素は相補性の一本鎖末端  
を有する異種DNA断片だけでなく平滑末端  
を有する異種DNA断片をも連結できる特性  
をもつているため、同一制限酵素で両DNA  
を切断した場合には、それらの末端が接着末  
端であり、平滑末端であれ連結できる。両

DNAを異なる制限酵素で切断してもいずれ  
も平滑末端のときは連結できる。また両DNA  
を異なる接着末端を与える制限酵素で切断し  
たときもエキソヌクレアーゼやS1ヌクレア  
ーゼで末端の一本鎖を削りとるか、DNAポ  
リメラーゼで一本鎖部分を修復して平滑末端  
にしてから連結することが可能である。

リガーゼ反応により目的の組換え体以外に  
同一断片どうしが連結したものも生成するが  
目的の組換え体を取得するにはこのDNA混  
成液を用いてコリネバクテリウム属またはブ  
レビバクテリウム属菌種を形質転換し、スト  
レプトマイシンあるいはスペクテノマイシン  
耐性形質を獲得した形質転換株を選択分離し  
その培養菌体から抽出単離することによつて  
達成できる。その一例としてpCO11をあげ  
ることができる。pCO11の具体的な作製法  
は実施例3に後述する。pCO11は先に特許  
出願(特願昭56-16101)したコリネ  
バクテリウム・グルタミクム225-57

(ATCC 31808, FERM-P 5865)から分離  
されたプラスミドpCO1中に1ヶ所だけ存在  
する制限酵素BglII(パチルス・クロビギイ  
から分離される制限酵素)切断部位にpCO4  
のストレプトマイシンおよび/またはスペク  
テノマイシン耐性遺伝子を含む2.5メガダル  
トンのBamHI切断DNA断片をそれら同一接  
着末端を利用してT4ファージDNAリガーゼ  
で連結して得たものであり、第1回に示す  
制限酵素切断地図で特徴づけられる構造を有  
している。

pCO11は、コリネバクテリウム・グルタミ  
クムLA103(L-22菌株)内で自律  
複製し、ストレプトマイシンおよび/または  
スペクテノマイシン遺伝子を選択マーカーと  
してもついているのでpCO4と同様な有用ベク  
ターとなる。さらにpCO11はpCO4に較べ  
各種制限酵素による切断点が少ないため、自  
律複製能および耐性遺伝子を損うことなく、  
試験管内DNA組換え技法によるDNA断片

特開昭57-183799(10)

もコリネバクテリウム属およびブレビバクテリウム属菌種全般にその有用性を適用できることは言うまでもない。

なお、pCG11 保有株コリネバクテリウム・グルタミクム LA 103 / pCG11 は米国アメリカン・タイプ・カルテヤー・コレクションに ATCC 39022 として寄託されている。

(2) 実施例2の後に下記の「実施例3」ならびに「4図面の簡単な説明」の欄を加入する。

#### 「実施例3 pCG11の作製

コリネバクテリウム・グルタミクム 225-280 から pCG4 を分離したのと同一の方法によりコリネバクテリウム・グルタミクム 225-87 から pCG1 を分離する。プラスミド pCG1 を制限酵素  $Bgl$  II (パチス・ダロビゲイから分離精製される制限酵素) (宝酒造社製)、プラスミド pCG4 を制限酵素  $Bam$  HI (宝酒造社製) で各々の制限酵素の適正条件にて完全消化する。両消化 DNA を各

0.5 μg 含むリガーゼ反応液(最終濃度： 6.6 mM トリス-ホウ酸、 6.6 mM MgCl<sub>2</sub>、 10 mM ジチオスレイトール、 0.5 mM ATP、 pH 7.6) 0.2 μl に 0.1 単位の T4 ファージ DNA リガーゼ(宝酒造社製)を混和し、 4°C で一晩反応する。この連結反応液を用いてコリネバクテリウム・グルタミクム LA 103 株のプロトプラストを形質転換する。

コリネバクテリウム・グルタミクム LA 103 株のプロトプラストは実施例2の方法のうち、培養途中のベニシリン G 濃加処理を除いた以外同じようにして調製する。形質転換操作および形質転換株の選択も実施例2と同様に行う。形質転換には上記連結反応液 0.1 ml を使用する。得られたスペクチノマイシン耐性株の一株から培養中のベニシリン G 濃加処理を省いた以外実施例1と同様な方法によりプラスミドを単離し、 50 μg のプラスミド DNA を得る。このプラスミド DNA を用い、各種制限酵素による単独消化および複数の制限酵

素による多重消化で生成する DNA 断片を実施例1と同様なアガロースゲル電気泳動で解析し、分子量およびプラスミド分子中の各制限酵素に対する切断部位を決定した。pCG1 と命名したこのプラスミドの制限酵素切断地図を第1図に示す。

pCG11 プラスミド DNA を用いて前記と同様にコリネバクテリウム・グルタミクム LA 103 株を形質転換して得られたスペクチノマイシン耐性形質転換菌は pCG11 と同一の各種制限酵素の切断模式で特徴づけられるプラスミドを保有していた。

#### 4図面の簡単な説明

第1図は pCG11 の制限酵素  $Eco$  RI,  $Pst$  I,  $Bgl$  II および  $Hinc$  II (ヘモフィラス・インフルエンザから分離精製される制限酵素) による切断地図を示す。図中の破線で記した  $Bgl$  II /  $Bam$  HI は連結部位を示す。」

(3) 明細書第5頁16行目の「 $Bam$  HI 6」を「 $Bam$  HI 7」に訂正する。

## 特許請求の範囲

(4) 明細書第22頁第2表中「Bam HI」の項を  
下記のとおり訂正する。

酵素	切 断 部位数	各生成断片の分子量 (メガダルトン)	加算して得られる pCGIの分子量 (メガダルトン)
Bam HI	7	8.25, 2.67, 2.61, 1.98, 1.95, 1.43, 0.8	19.49

- (5) 特許請求の範囲を別紙のとおり訂正する。
- (6) 第1図を別紙のとおり補充する。
- (7) 願書の「添付書類の目録」の欄に「(2)  
図面 1通」を加入する。

## 6. 添付書類の目録

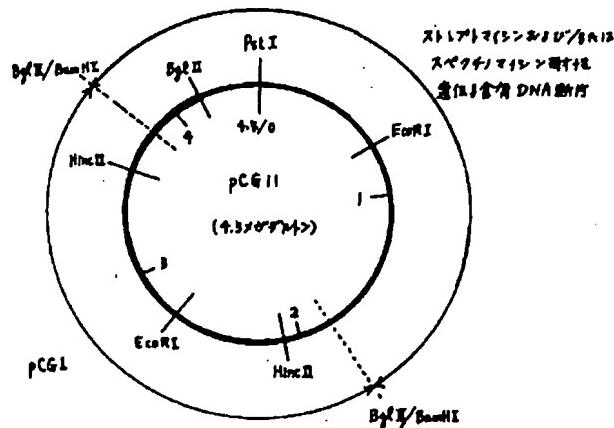
図 面

1通

- (1) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物中で自体複製でき、かつストレプトマイシンおよび/またはスペクチノマイシン耐性に関与する遺伝子を有する新規プラスミド。
- (2) 該プラスミドが、コリネバクテリウム属微生物から得られることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のプラスミド。
- (3) 該微生物が、コリネバクテリウム・ダルタミクムに属する微生物であることを特徴とする特許請求の範囲第2項記載のプラスミド。
- (4) 該微生物が、コリネバクテリウム・ダルタミクム 225-250であることを特徴とする特許請求の範囲第3項記載のプラスミド。
- (5) 該プラスミドが、コリネバクテリウム・ダルタミクム 225-250から得られ、約 1.9 メガダルトンの分子量を有し、かつ制限酵素に対する感受性部位数が EcoRI, BamHI, HindIII,

pst] および Sal I] においてそれぞれ 4, 7,  
9, 6 および 0 であることを特徴とする特許  
請求の範囲第1項記載のプラスミド。

## 第 1 図



昭 62. 10. 19 発行

手 続 楽 正 書

昭和62年5月28日

特許庁長官 殿



特許法第17条の2の規定による補正の掲載

昭和 56 年特許願第 58186 号(特開 昭  
57-183799 号, 昭和 57 年 11 月 12 日  
発行 公開特許公報 57-1818 号掲載)につ  
いては特許法第17条の2の規定による補正があつ  
たので下記のとおり掲載する。 3 (2)

Int.C1.	識別記号	庁内整理番号
C07H 21/00		7138-4C
C12N 15/00		7115-4B
// C12R 1/13		
1/15		

1. 事件の表示

昭和 56 年特許願第 58186 号

2. 発明の名称

新規プラスミド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 100

住 所 東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号

名 称 (102) 協和醸酵工業株式会社

(TEL : 03 - 282 - 0036)

代表者 加藤 錠 夫



4. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

5. 補正の内容

(1) 明細書第 10 頁 3 ~ 5 行目「それらのシードで

ある。」を「それらの受託番号は各々、微工研  
菌寄第 5939, 5940 号である。」に訂正  
する。

(2) 明細書第 14 頁 4 ~ 6 行目「各々……つけら  
れている。」を「各々受託番号 微工研菌寄第  
5941, 5942, 5943 号がつけられて  
いる。」に訂正する。

6.添付書類の目録

微生物受託番号通知書(写) 1通